

SeroELISA™ Chlamydia IgA

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos específicos IgA de Chlamydia en suero humano

Manual de instrucciones

Kit de 96 deteminaciones (Nº de catálogo 113-01)
Para uso exclusivo de diagnóstico in vitro.
Exclusivamente para uso professional
Guardar a 2-8ºC. **No congelar.**



Savyon® Diagnostics Ltd.
3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL
Tel: +972.8.8562920
Fax: +972.8.8523176
E-mail:support@savyondiagnostics.com

Uso previsto
El kit de SeroELISA™ IgA Chlamydia se usa para la determinación de anticuerpos específicos IgA contra Chlamydia en muestras humanas de suero por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Sólo para uso en diagnóstico *in vitro.*

Introducción

Chlamydia es una bacteria intracelular Gram-negativa que causa enfermedades agudas y crónicas en mamíferos y aves. El género Chlamydia comprende cuatro especies: *C. trachomatis, C. pneumoniae, C. psittaci* y *C. pecorum.*

C. trachomatis se divide en 15 serovariedades (1). Las serovariedades A, B, Ba y C causan tracoma (2), causa predominante de la ceguera prevenible en países endémicos del tercer mundo. Las serovariedades L_1-L_3, son agentes del linfogranuloma venéreo. Las serovariedades D-K son la causa más común de enfermedades genitales transmitidas sexualmente en todo el mundo: cervicitis, endometritis/ salpingitis (3) en mujeres y uretritis (4) en ambos sexos. La endometritis/salpingitis puede conducir a una oclusión tubal que conlleva un riesgo mayor de embarazos extrauterinos e infertilidad. La infección genital puede causar infección aguda o persistente sin síntomas clínicos. Generalmente, estas infecciones son tratables una vez diagnosticadas. Sin tratamiento, estas infecciones progresarían a inflamación crónica severa que conduciría infertilidad, embarazos ectópicos, aborto inducido o parto precoz. Los bebés infectados durante el parto podrían desarrollar conjuntivitis y neumonía (5).

C. pneumoniae es un importante patógeno respiratorio en humanos, causante de más del 10% de casos de neumonía. Se asocia con numerosas patologías respiratorias agudas como neumonía, asma, bronquitis, faringitis, síndrome respiratorio agudo con anemia falciforme, enfermedad coronaria cardíaca y síndrome de Guillain-Barré (6).

C. psittaci puede infectar a diversos tipos de especies hospedadoras: moluscos, aves o mamíferos y también causa neumonía severa.

Los tests serodiagnósticos, basados en marcadores inmunológicos específicos, sirven como herramienta diagnóstica no invasiva en la identificación de infecciones distales y profundas (7).
El anticuerpo IgA específico de Chlamydia, es un marcador inmunológico de infecciones primarias, crónicas y recurrentes (8). El anticuerpo IgA anti-Chlamydia tiene valor diagnóstico para pacientes con uretritis no gonocóccica (9), mujeres con salpingitis aguda, mujeres con infertilidad mecánica (10), en embarazos ectópicos, prostatitis, epidedimitis, conjuntivitis, síndrome de Reiter (10) y neumonitis.

El test SeroELISA™ de Chlamydia usa la serovariedad L_2 que reacciona con el antígeno de *C. trachomatis*. Este test detectará anticuerpos de *C. trachomatis, C. psittaci* y *C. pneumoniae* (TWAR).

Principio del ensayo

- El suero humano a testar se podrá en contacto con material antigénico recubriendo los pocillos. En caso de que los anticuerpos estén presentes en el suero del paciente, éstos se unirán a los antígenos en fase sólida formando un complejo y el resto de los componentes serán eliminados durante la fase de lavado.
- La peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con anticuerpo anti-IgA humana (cadena α-específica) se adiciona a los pocillos. Si en el paso previo se formó un complejo antígeno-anticuerpo, la peroxidasa conjugada con el anticuerpo anti-IgA se unirá al anticuerpo del complejo. Si no se formó ningún complejo antígeno-anticuerpo en el paso previo, el conjugado será eliminado durante la fase de lavado.
- Se adiciona sustrato TMB. Si la reacción es positiva, se origina un color azul en los pocillos al que sigue una reacción enzimática entre la peroxidasa, el peróxido y el cromógeno. Una vez se ha detenido la reacción enzimática mediante adición de solución ácida, se mide la absorbancia en los pocillos, usando un espectofotómetro a 450 nm.
- La absorbancia a 450 nm es indicativa de la concentración de anticuerpos IgA anti-Chlamydia en el suero de los pacientes.

Procedimiento del ensayo

1. Antígeno de Chlamydia unido a la fase sólida (Ag) + Suero positivo para IgA anti-Chlamydia (Ac_1)



Complejo $AgAc_1$

2. Complejo $AgAc_1$ + Conjugado de anticuerpo anti-IgA humana con HRP (Ac_2)

🡻



Complejo $AgAc_1Ac_2$

3. Complejo $AgAc_1Ac_2$ + Sustrato TMB



Solución azul

🡻 🡸 Solución de parada Cromógeno

Solución amarilla

(Determinación de la absorbancia a 450 nm)

Advertencias y precauciones

- **Advertencia**: EL MATERIAL ANTIGÉNICO CHLAMIDIAL HAS SIDO INACTIVADO POR LO QUE NO CONTIENE ORGANISMOS VIVOS DETECTABLES. EN CUALQUIER CASO, LAS TIRAS DEBEN SER TRATADAS E ELIMINADAS COMO SI SE TRATARA DE MATERIAL POTENCIALMENTE INFECCIOSO.

  Precauciones: este kit contiene suero humano testado según las técnicas aprobadas de la FDA, y confirmado negativo para el antígeno de HBV y los anticuerpos de HCV, HIV-1 y HIV-2. Ningún método puede asegurar que los productos derivados de sangre humana no transmitan infecciones, todos los componentes derivados de sangre humana suministrados con este kit deben ser manejados como suero o sangre potencialmente infecciosos de acuerdo con las recomendaciones publicadas en el manual de CDC/NIH "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos, 1988".
- La solución cromógeno/sustrato es un material irritante para la piel y las mucosas membranosas. Evite el contacto directo.
- **Uso para diagnóstico in vitro exclusivamente.**

Contenido del kit

1. Microplaca recubierta (96 pocillos por placa). Cada envase contiene una microplaca con 12 tiras que se pueden quitar sobre la estructura plástica soporte de la placa. Cada tira está recubierta con antígenos de Chlamydia.
   1 Unidad
2. Control positivo (suero humano positivo para anticuerpo IgA de Chlamydia). Listo para usar.
   1 Vial, 2,0 ml
3. Control positivo bajo (suero humano levemente positivo para anticuerpo IgA de Chlamydia). Listo para usar.
   1 Vial, 2,0 ml
4. Control negativo (suero humano negativo para anticuerpo IgA de Chlamydia). Listo para usar.
   1 Vial, 2,0 ml
5. Conjugado de anti-IgA humana (cadena α-específica) con HRP. Listo para usar.
   1 Vial, 10 ml
6. Diluyente para el conjugado. Listo para usar.
   1 Botella, 25 ml
7. Solución de lavado concentrada (x20)
   1 Botella, 100 ml
8. Sustrato TMB. Listo para usar.
   1 Vial, 14 ml
9. Solución de parada (H_2SO_4 1M). Listo para usar.
   1 Botella, 15 ml
10. Tapa para placa.
    1 Unidad
11. Manual de instrucciones **1**

Materiales requeridos no suministrados

1. Tubos perfectamente limpios para la dilución del suero de los pacientes.
2. Micropipetas ajustables, o pipetas multicanal (rangos de 5-50, 50-200 y 200-1000 µl) y puntas desechables.
3. Pipetas de plástico desechables (diferentes tamaños) y dispositivos de seguridad para pipetear.
4. Frasco volumétrico de un litro.
5. Cilindro volumétrico de 50 ml.
6. Lavador de la placa de ELISA o botella de lavado.
7. Toallas de papel o papel adsorbente.
8. Mezclador Vórtex.
9. Baño de agua a 37ºC con tapa o cámara húmeda metida dentro de un incubador a 37 ± 1ºC.
10. Lector de ELISA con filtro de 450 nm.
11. Agua destilada o doblemente desionizada para la solución de lavado tamponada concentrada.

Almacenamiento y estabilidad de los reactivos

Todos los materiales suministrados deben ser guardados a 2-8ºC. Si se guardan a una temperatura entre 2 y 8ºC, los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit. La exposición de componentes sellados a temperatura ambiente durante unas horas no causa daño a los reactivos. **¡NO CONGELE!**

Una vez el kit está siendo usado, su estabilidad es de 60 días desde el día de apertura por primera vez. Una vez abierto, la envoltura de aluminio que contiene las tiras debe cerrarse con celo. No debe tirarse la bolsa con agente desecante.

Recogida de muestras

Las muestras séricas deben tomarse en condiciones asépticas y almacenarse a 2-8ºC usando azida sódica (NaN_3) al 0,05% como conservante si se van a usar a los pocos días. Para períodos prolongados, las alícuotas de muestras séricas deben almacenarse a -20ºC.

Debido a que las muestras séricas turbias o hemolíticas dan resultados menos reproducibles, se recomienda usar muestras cristalinas y sin restos de componentes sanguíneos.

Procedimiento del ensayo

Notas:

a) Los componentes se testan específicamente para cada test. No mezcle componentes de diferentes lotes o de otros manufacturadores.

b) Todos los reactivos deben atemperarse a temperatura ambiente antes de usarlos. El diluyente de muestras y el diluyente del conjugado gelatinizan al ser refrigerados. Si fuera necesario acelerar la liquefacción, calentar estos componentes a 37ºC durante unos minutos.
Puede darse la formación de cristales de sal en la solución de lavado tamponada concentrada cuando se guarde a 2-8ºC. Estos cristales deben disolverse completamente calentando a 37ºC antes de usar la solución.

c) No realice el test en presencia de vapores reactivos (por ejemplo, sustancias alcalinas, ácidas o aldehídicas) o polvo, ya que la actividad enzimática de la HRP conjugada a anti-IgA humana puede verse afectada.

d) No toque la parte superior de las tiras. No toque las paredes de los pocillos con las puntas cuando dispense los reactivos.

e) Use puntas de pipeta desechables. Evite la contaminación cruzada entre reactivos.

f) Golpee el vial suavemente sobre una superficie dura para que no quede líquido adherido a la tapa.

g) Evite la formación de burbujas en los pocillos.

h) Dispense los líquidos despacio para evitar que salgan como espray.

i) El control positivo, el control positivo bajo y el control negativo deben pasarse conjuntamente con el suero a testar cada vez que el test se lleve a cabo.

j) Se debe dejar un pocillo en cada test como blanco, cada vez que se lleve a cabo el test.

k) Todos los procedimientos del ensayo deben llevarse a cabo secuencialmente sin interrupciones.

Procedimiento del ensayo – Manual

Protocolo de automatización disponible bajo petición

A) Lavado de las tiras

Se recomienda prelavar las tiras aunque no es obligatorio. En cualquier caso, las tiras deben ser humidificadas con solución de lavado antes de aplicar las muestras y deben ser secadas volcándolas sobre papel adsorbente, antes de realizar el test.
Si el proceso automático de lavado de la placa de ELISA no puede realizarse, debe seguirse el siguiente procedimiento:

1. Saque el número de tiras que necesite de su envoltura de aluminio y colóquelos en la estructura soporte de la placa.
2. Diluya la solución de lavado tamponada concentrada a 1:20 con agua destilada.
   Por ejemplo: para una tira prepare 100 ml de solución de lavado (5 ml de solución concentrada con 95 ml de agua destilada). Mezcle cuidadosamente durante 20 minutos.
   La solución de lavado debe preparase antes de ser usada y lo que sobre debe tirarse.
3. Tras la incubación, rellena cada pocillo hasta la mitad con solución de lavado.
4. Deje la solución dentro del pocillo durante unos dos minutos y luego elimínela de las tiras. Repita este paso **2** veces.
5. Seque la parte superior de las tiras y la estructura soporte volcándolas cuidadosamente sobre papel adsorbente.
   Complete el lavado de los pocillos tras la incubación para obtener mejores resultados. No deje restos de la solución de lavado en los pocillos.

B) Incubación de las muestras séricas y los controles

6. Diluya cada muestra de paciente a 1:64 con el diluyente de muestras siguiendo el siguiente esquema:
   1:16 - Añada 10 µl de suero de paciente a 150 µl de diluyente de muestras.
   1:64 - Añada 30 µl de la dilución a 1:16 a 90 µl de diluyente de muestras.
   Los **controles** se suministran listos para usar por lo que no deben ser diluídos.
7. Pipetee 50 µl del control positivo, del control bajo positivo, del control negativo y de la dilución 1:64 del suero de paciente y dispénselo en los diferentes pocillos.
   Pipetee 50 µl del diluyente de muestras en uno de los pocillos y dispénselo en el que vaya a considerar el blanco.
   El pipeteo de los controles y de las muestras séricas, no debe exceder los 10 minutos.
8. Cubra las tiras con una tapa para la placa e incúbelas durante 30 minutos a 37ºC en una cámara humidificadora.
9. Deseche el líquido de los pocillos. Lave los pocillos **5** veces y séquelos según el procedimiento indicado en los pasos A) 3-5.

C) Incubación con el conjugado

10. Dispense 50 µl de solución de conjugado de anti-IgA humana con HRP ya diluída sobre cada pocillo.
11. Cubra las tiras con una tapa para la placa e incúbelas durante 30 minutos a 37ºC en una cámara humidificadora.
12. Deseche el líquido de los pocillos. Lave los pocillos **5** veces y séquelos según el procedimiento indicado en los pasos A) 3-5.

D) Incubación con el sustrato TMB

13. Dispense 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo.
14. Cubra las tiras con una tapa para la placa e incúbelas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
15. Pare la reacción añadiendo 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
    Dispense la solución de parada siguiendo la misma secuencia y los mismos intervalos de tiempo que como lo hizo al dispensar el sustrato TMB en el paso D 14.
16. Calibre el espectrofotómetro sobre el pocillo blanco. Determine la absorbancia a 450 nm y guarde los resultados.
    Se recomendaría realizar una determinación de la absorbancia inmediatamente pero no es obligatorio. La determinación de la absorbancia no debe exceder los 30 minutos ya que es lo que dura la reacción cromogénica.

Criterios de aceptabilidad

Un test realizado es válido si:

- La absorbancia del control positivo es ≥ 0,8 a 450 nm.
- La absorbancia del control positivo bajo es ≥ 0,4 a 450 nm.
- La absorbancia del control negativo es ≤ 0,15 a 450 nm.

Si no se cumplen estas condiciones el test llevado a cabo no se considera válido y deberá ser repetido.

Cálculo del valor de Cut-Off (COV)

El valor de cut-off se calcula siguiendo la siguiente fórmula:

$$COV = 0{,}198 \times (Pc - Nc) + Nc$$

Pc = Absorbancia del control positivo a 450 nm.
Nc = Absorbancia del control negativo a 450 nm.

Interpretación de los resultados del test

Absorbancia a 450 nm	Interpretación de los resultados	Titulación estimada de IgA anti-Chlamydia
Entre COV – 0,03	Negativo	< 64
COV ± 0,03	Equívoco*	64
Entre por encima del valor de COV + 0,03 y el control positivo bajo	Bajo positivo	64-128
Entre por encima del valor del control positivo bajo y el control positivo	Positivo	256-512
Por encima del valor del control positivo	Alto positivo	≥ 512

*Vuelva a testar las muestras séricas clasificadas como equívocas. Si se repite el resultado equívoco, se recomienda repetir el test.

Significancia de los resultados

La experiencia clínica indica que los anticuerpos IgA contra Chlamydia sirven para confirmar una infección activa o crónica por Chlamydia (3,11,12).

Determinación del índice de titulación

Para monitorizar el perfil inmunológico de un paciente, deben ser comparadas las muestras séricas obtenidas durante la convalecencia y durante la fase aguda. El índice de titulación de la pareja de sueros debe realizarse con ambas muestras séricas testadas en el mismo run. El valor de dilución mayor por encima del valor de cut-off es el **índice de titulación**.

Limitaciones del ensayo

- Ningún test serológico debe usarse como único criterio diagnóstico. Todos los datos clínicos y de laboratorio deben tenerse en cuenta.
- El test de ELISA usa una única serovariedad (L_2). L_2 contiene determinantes antigénicos existentes en serovariedades de *Chlamydia trachomatis* así como en el grupo antigénico. Los anticuerpos anti-*Chlamydia psitacci*, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) y *Acinetobacter calcoaceticus* deben detectarse por este ELISA.
- La significancia de las titulaciones de la muestra debe ser considerada en relación a las características de la población que está siendo testada. Estas características incluyen edad, área geográfica y comportamiento sexual, entre otros factores.
- Este test no indicaría la ubicación de la infección por Chlamydia. No pretende reemplazar el aislamiento de células de cultivo, si éste está disponible.
- La ausencia de anticuerpos medibles en suero no excluye de la posibilidad de infección por Chlamydia.
- Los sueros contaminados por bacterias o hiperlipémicos podrían causar resultados erróneos.

Características del proceso

El test Chlamydia SeroELISA™ se comparó con el test Chlamydia IgG/IgA IPAzyme™ (producto de Savyon Diagnostics, Cat. No. 011-01) que es un test serológico aceptado para la detección del anticuerpo IgA de Chlamydia. El estudio poblacional incluye pacientes sospechosos de infección por Chlamydia así como individuos sanos (n = 200).

Comparación de SeroELISA™ con IPAzyme™

SeroELISA™ / IPAzyme™	Positivo	Negativo	Total
Positivo	96	4	100
Negativo	7	93	100
Total	103	97	200

Acuerdo general: (189/200) x 100 = 94,5%

Reacción cruzada

Los pacientes hospitalizados, infectados por *Neisseria gonorrea, Staphylococcus aureus* y *Peptostreptococcus anaerobius,* que fueron diagnosticados mediante kits serológicos comerciales, fueron también testados con el kit de Chlamydia SeroELISA. No se detectó ninguna reacción cruzada.

Bibliografía

1. **Yuan, Y., Zhang, Y. X., Watkins, N. G. and Caldwell, H.D.** (1989). Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences for the Four Variable Domains of the Major Outer Membrane Proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* Serovars. Infection and Immunity. 57:1040-1049. Copyright 1989, American Society for Microbiology.
2. **Treharne J. D.** (1985). The community epidemiology of trachoma. Rev Infect Dis. 7:760-763.
3. **Piura, B., Sarov, I., Sarov, B., Kleinman, D., Chaim, W. and Insler, V.** (1985). Serum IgG and IgA antibodies specific for *Chlamydia trachomatis* in salpingitis patients as determined by the immunoperoxidase assay. Eur. J. Epidemiol 1: 110-116.
4. **Wang, S.P., Grayston, J.T., Kuo, C.C., Alexander, E.R., and Holmes, K.K.** (1977). SeroDiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the microimmunofluorescence test. In: Nongonoccolcal urethritis and related infection, D. Hobson and K.K. Holmes (Eds), P. American Society for Microbiology, Washington DC. p. 237-248.
5. **Thompson III S. E., and Dretler R. H.** (1982). Epidemiology and Treatment of Chlamydial Infections in Pregnant Women and Infants. Review of Infectious Diseases **4:**S747
6. **Saikku P., Mattila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Ekman, M.R., Makela, P.H., and Valtonen, V**. (1988). Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infection. Lancet II: 983-986.
7. **Sarov, I., B., Lunenfeld, E., Zion, H., Chaim, W. and Piura, B.** (1988) The significance of chlamydia Specific Serum IgA in Chlamydia trachomatis Infections. In Proceedings of The European Society for Chlamydia Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, pp.234-237.
8. **Sarov, I., Cevenini, R., Sarov, B., Romano, A., Regenbogen, L., Yassur, Y., David, R., Insler, V., Chaim, W., and Kleinman, D. (**1985) The significance of Specific Serum IgA Antibodies in the Diagnosis of Primary, Recurrent and Persistent Viral and Chlamydia Infections. Rev. Int. Trach. Pathol. Ocul. Trop. Subtrop. Sante Publique, Vol. 62 (1-2), pp. 21-34, ISSN: 0246-0831.
9. **Sarov, I., Insler, V., Sarov, B., Cevenini, R., Rumpianesi, F., Donati, M., Kleinman, D., Piura, B., Lieberman, J., Kimmel, N., Friedman, M. and La Placa, M**. (1984). Specific Serum IgA Antibodies in the Diagnosis of Active Viral and Chlamydial Infections. In: New Horizons in Microbiology, Elsevier Biomedical Press, ed. Sanna, A. and Morace, G. p. 157.
10. **Scheel, O. and Anestad, G.** (1989). Significance of Immunoglobulin A titers in the Diagnosis of Urogenital Chlamydial Infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8: 726-728.
11. **Sarov, I., Sarov, B., Lunenfeld, E., Zion, H. Chaim, W. and Piura, B.** (1988) The significance of chlamydia Specific Serum IgA in Chlamydia trachomatis Infections. In Proceedings of The European Society for Chlamydia Research, Societa Editrice Esculapio, Bologna, pp.234-237.
12. **Cevinini, R., Sarov, I., Rumpianesi, F., Donati, M., Melega, C., Varotti, C. and La Placa, M.** (1984). Serum Specific IgA Antibody to Chlamydia Infections Detected by ELISA and an Immunofluorescence Test. J. Clin. Pathol. 37:686-691.



Obelis s.a. (European Authorized Representative Center)
Boulevard Général Wahis 53, 1030 Brussels, Belgium
Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03
e-mail: mail@obelis.net